

明細書

ラクトフェリン・ポリペプチド及びその製造法並びに炎症誘起物質

5 技術分野

本発明は、ラクトフェリン分子中に含まれる、炎症性サイトカインの産生誘導能、ケモカインの産生誘導能などの炎症誘起作用を有する新規ペプチドに関する発明である。

10 背景技術

(特許文献1)特開2003-289749号公報

(特許文献2)特開2004-002471号公報

(非特許文献1)Annu. Rev. Nutr. 1995. 15. 93-110., Pediatr. Res. 1996. 40. 257-262., J. Peptide Res. 2001. 57. 240-249., J. Vet. Med. Sci. 2002. 64.

15 873-878

(非特許文献2)FEMS Microbiol. Lett. 1996. 145. 209-214., Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. 95., 12641-12646. Mol. Microbiol. 2003. 47. 607-617.

ラクトフェリンは多機能性の糖タンパクで、各種疾患において乳汁、唾液、涙、
20 糞便、尿や血液などの体液中に増加する。また、抗菌作用、抗ウイルス作用、リンパ球の活性化作用、抗腫瘍作用鉄結合性など、生体にとって有益な作用が数多く報告されている(非特許文献1: Annu. Rev. Nutr. 1995. 15. 93-110., Pediatr. Res. 1996. 40. 257-262., J. Peptide Res. 2001. 57. 240-249., J. Vet. Med. Sci. 2002. 64. 873-878.)。そのため、ラクトフェリンを各種疾患に応用する研究が多く成
25 されている。一方、細菌性疾患で増加するラクトフェリンは、細菌の産生する酵素などにより切断されその作用は失活するものと考えられている(非特許文献2: FEMS Microbiol. Lett. 1996. 145. 209-214., Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. 95., 12641-12646. Mol. Microbiol. 2003. 47. 607-617.)。そのため、感染菌による炎症像がラクトフェリンの存在にもかかわらず悪化すると考えられている。また、ウ

シの細菌性疾患であるウシ乳房炎において、乳汁中に催炎作用を示す「炎症性ラクトフェリン」という分子量30～60kDaのラクトフェリン蛋白群が増加し、炎症を増悪することが報告されている（特許文献1：特開2003-289749号公報）。しかしながら、この炎症性ラクトフェリン蛋白群においては、催炎作用を示す詳細な部位も構造も明らかとされておらず、その性状と生理的な作用意義には不明の点が多い。

一方、特許文献2（特開2004-002471号公報）には、次のペプチドが記載されている。

「A l a - P r o - A r g - L y s - A s n - V a l - A r g - T r p - C y
s - T h r - I l e - S e r - G l n - P r o - A s p - S e r - P h e - L y
s」のアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである。また、特許文献2には、ウシ・ラクトフェリンを、プロテアーゼにより酵素分解し、酵素分解物から上記ペプチドを採取する技術が記載されている。

炎症性疾患において体液中に増加するタンパクとして、セリンプロテアーゼの一種である、白血球の産生するエラスターゼがある（Clinica.Chemica.Acta. 1995. 239. 91-101.）。エラスターゼは、炎症時には補体成分やグロブリンを分解することが知られている（Am.J.Pathol. 1979. 94. 75-83., Elastase. (R.P.Mecham, ed) 1986. Catalytic and biological properties. In: Biological of Extracellular Matrix Orlando, FL: Academic Press, 217-320., Biochemistry. 1997. 16. 3390-3396.）。しかしながら、このエラスターゼとラクトフェリンの関与を報告した事例はない。また、細菌性疾患で、細菌の産生する酵素により分解されるラクトフェリンについても、その生理作用は報告されていない。

特許文献2記載のペプチドは、免疫賦活剤であり、炎症誘起活性を有するものではない。

本発明では、炎症性疾患で増加するエラスターゼに着目し、ラクトフェリンが分解されることを明らかとし、分解されたラクトフェリン中に各種炎症性サイトカインやケモカインの産生誘導活性を有するポリペプチドを分離できるようにしたものである。また、このポリペプチドより、ヒトのラクトフェリンに存在するアミノ酸配列を有するポリペプチドを合成し、この様な炎症誘起活性を有する新規ラクト

フェリン・ポリペプチドを見出した。本発明はこの新知見に基づき発明したものである。

本発明は、炎症誘起作用を有するラクトフェリン・ポリペプチドを提供することを目的とする。

5 本発明は、炎症誘起物質を提供することを目的とする。

本発明は、炎症誘起作用を有するラクトフェリン・ポリペプチドを唾液中より単離・精製する製造方法。及び、その合成ペプチドの製造法を提供することを目的とする。

10 発明の開示

本発明のラクトフェリン・ポリペプチドは、フェニルアラニン(F)、リシン(K)、アスパラギン酸(D)のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

ラクトフェリン・ポリペプチドは、分子量25kDa未満であることが好ましい。

15 ラクトフェリン・ポリペプチドは、ヒト・ラクトフェリンをプロテアーゼにより分解することで得られたものであることが好ましい。

本発明の炎症誘起物質は、各種炎症性サイトカイン産生誘導活性を有する前記ラクトフェリン・ポリペプチドと、その合成ペプチドによることを特徴とする。

本発明の炎症誘起物質は、各種ケモカイン産生誘導活性を有する前記ラクトフェリン・ポリペプチドと、その合成ペプチドによることを特徴とする。

20 本発明の炎症誘起物質は、サイトカインやケモカインなどの炎症メディエーターの産生を誘導する細胞内転写因子である、NF κ Bの発現増強作用を有する前記ラクトフェリン・ポリペプチドと、その合成ペプチドによることを特徴とする。

本発明の合成ペプチドを作成する製造法は、ヒト乃至ウシ・ラクトフェリンをプロテアーゼにより分解し、SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動法、ゲルろ過法、
25 コンカナバリンA(Con A)アフィニティークロマトグラフィー法、ラクトフェリン抗体結合アフィニティークロマトグラフィー法により精製して、フェニルアラニン(F)、リシン(K)、アスパラギン酸(D)のアミノ酸配列を含むラクトフェリン・ポリペプチドを単離し、アミノ酸シーケンサーにより確定し、合成ペプチドを作成することを特徴とする。

本発明は、炎症性疾患（歯周病）を罹患したヒトの唾液を、50%飽和硫酸アンモニウム沈殿法により濃縮後、トリス-塩酸緩衝液で脱塩後、ヒト・ラクトフェリン抗体(ICN Pharmaceuticals, Inc., USA) CNBr 活性化Sephadex 4B(Pharmacia, Sweden)によりラクトフェリンを精製した。さらに、ヒト・ラクトフェリン(ICN Pharmaceuticals, Inc., USA)をメタロプロテアーゼの一種である、エラスターゼ(SIGMA, USA)により37℃で1時間処理し、その後、エラスターゼ阻害剤(CALBIOCHEM-NOVABIOCHEM, Inc., USA)により反応を停止した。そして、炎症性疾患の検体から得られたラクトフェリンと、エラスターゼ処理したラクトフェリンを、コンカナバリンA (Con A) 二次元免疫電気泳動法によりその泳動像を観察した。

さらに、炎症性疾患検体とエラスターゼ処理ヒト・ラクトフェリンは15%アクリルアミドゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS PAGE) により泳動した。泳動後、PVDF膜(BioRad, USA)に転写し、各検体に共通して認められたバンドを切り出した後、N-末端アミノ酸配列をアミノ酸シークエンサー(Hewlett Packard, USA)により解析した。そして、各ラクトフェリン・ポリペプチドを作成し、サイトカインならびにケモカインの産生誘導能を各種細胞により解析し、炎症誘起活性を有するペプチドを確定した。

なお、特許文献2に記載されているペプチドのアミノ酸配列は、本願発明に係るペプチドのアミノ酸配列とは異なる。

本願発明におけるアミノ酸配列は、Phe-Lys-Asp(略記号:FKD)を含むペプチドである。また、N-アミノ酸配列の位置もC末領域に近い部分に位置している。さらに、FKDは、ヒト・ラクトフェリンでは2箇所、ウシ・ラクトフェリンでは一箇所しか存在しない。

そのため、このFKDを含むラクトフェリン・ポリペプチドが炎症誘起作用を示すものである。

本発明によると、アミノ酸配列 (FKD) を有している新規ラクトフェリン・ポリペプチドは催炎作用を有する物質であり、「催炎性ラクトフェリン・ポリペプチド」と呼べる物質であった。そして本発明により、従来のラクトフェリンが持つ有益な生理作用の他に、催炎作用を持つドメインの発見は、ラクトフェリンの有効利用、炎症性疾患ならびに各種感染症など、多くの研究分野の進展に大きく寄与する発明

である。

図面の簡単な説明

第1図は、歯周病患者唾液中ラクトフェリンとエラスターゼ処理後のヒト・ラクト

5 フェリンのSDS PAGEならびにCon A二次元免疫電気泳動像。

第2図は、エラスターゼ処理後のヒト・ラクトフェリンの分子量とCon A二次元免疫電気泳動像の変化。

第3図は、分子量ならびにN-末端アミノ酸配列とラクトフェリン分子中の位置。

第4図は、作成ヒト・ラクトフェリン・ポリペプチドとの共培養による、炎症性サイトカイン、ケモカインおよびNF κ Bp65の発現増強効果。

発明を実施するための最良の形態

ヒトの炎症性疾患の検体とエラスターゼ処理した検体では、検体中のラクトフェリンの小分子化の起こっていることが確認された。また、この際のCon A二次元免疫電気泳動像でも、両検体はCon A親和性の弱い画分の出現することが判明した。

第1図に示す。

エラスターゼ濃度を0.001 unit~1.0 unitまで、段階的に変え反応させたところ、エラスターゼの反応濃度の増加に従い、分子量20kDa近辺の小分子のラクトフェリンが増加した。さらに、Con A二次元免疫電気泳動においてもCon A親和性の弱い画分が増加した。この小分子化したラクトフェリンは、ウシ乳房炎乳汁で報告されている、「炎症性ラクトフェリン」蛋白群（分子量30~60kDa）とは明らかに異なる分子量のものであった。第2図に示す。

ヒトの炎症性疾患の検体と、エラスターゼ処理した検体に共通して認められたラクトフェリン・ドメインは、第1図に示した通りである。この内、ヒトならびにウシで、N-末端側にあるドメインは既に抗菌活性や、腫瘍細胞に対するアポトーシス活性が報告されているアミノ酸配列を含んでいた。また、ヒトのドメインではN-末端アミノ酸配列の中ほどに位置するドメインには、免疫抑制作用を有するミニドメインの一部が含まれていた。これより下流に位置する他の二つのドメインは未報告のものであった。第3図に示す。

これらラクトフェリン・ドメインのうち、既にその作用が報告されているドメインを除外し、エラスターゼ処理したヒト・ラクトフェリンと炎症性疾患分泌液中のラクトフェリンに共通して認められた、分子量20～25 kDaの主たる二つのラクトフェリン分子は、アミノ酸配列の解析結果から、N-末領域に位置することが判明した。そして、この二つのドメインからペプチドを作成し、その生理作用について解析した。作成したポリペプチドは表1に示した通りである。

(表1)

表1. 作成したヒト・ラクトフェリン・ペプチドの一覧

作成ペプチド	アミノ酸配列	ヒト・ラクトフェリン分子中の位置
HuPep1.	FKDCHLA	243 to 249
HuPep2.	VPSHAVVAR	251 to 259
HuPep3.	FQLFGSP	287 to 293
HuPep4.	GQKDLLFKDSAI	295 to 307

; @

これら作成ポリペプチドは、健康なヒトの抹消血を、ヘパリンナトリウムを用いて採血し、リンフォライトH (Cedarlane, Canada) を用いた比重遠心法によりリンパ球を分離し、これを用いて各種サイトカインならびにケモカイン産生誘導能と、細胞内転写因子であるNF κ Bp65の発現誘導能を解析した。ヒトのサイトカイン(IL-6とTNF α ; Techne Co., USA)、ケモカイン(IL-8とMCP-1; American Research Product, Inc., USA)およびNF κ B(TransAM NF κ B family transcription factor assay kit; Active Motif, Co., USA)の測定は酵素抗体法により測定した。

エラスターゼ処理ヒト・ラクトフェリン中から分離し作成したポリペプチドのうち、HuPep1.とHuPep4.で、図2に示したとおり、炎症性サイトカインのIL-6の産生誘導能が確認された。また、これらのポリペプチドでは、炎症時に血液中に増加するIL-8とMCP-1の産生誘導能や、これらサイトカインやケモカインの産生誘導をつかさどる、細胞内転写因子のNF κ Bp65の発現増強も確認された。このHuPep1.ならびにHuPep4.は、FKDのアミノ酸配列が共通していた。図4に示す。

本発明において見出された、エラスターゼにより分解された、ヒトのラクトフェリン中に含まれる、FKDのアミノ酸配列を含む新規ラクトフェリン・ポリペプチドは、ヒトでは2箇所あった。そして、この新規ラクトフェリン・ポリペプチドは、細胞内の転写因子であるNF κ Bの発現を増強し、細胞障害作用などを示すサイトカインや、白血球の遊走化活性を示すケモカインの産生を誘導し、炎症を引き起こす物質であった。さらに、NF κ Bは一酸化窒素(NO)、アラキドン酸代謝産物や各種酵素などの炎症メディエーターの産生を誘導することが知られている。そのため、本発明で見出された新規ラクトフェリン・ポリペプチドは、これら炎症メディエーターの産生誘導能を示すことは容易に想定される、新規のラクトフェリン・ポリペプチドである。また、この新規ポリペプチドは、エラスターゼ以外のプロテアーゼによってラクトフェリン分子が分解され、出現することが可能と考えられる。この、FKDを含むアミノ酸配列はウシのラクトフェリン中にも一箇所(N末端より300番目から302番目)あり、ヒトのラクトフェリンで確認されたポリペプチドと近い位置に存在する。また、エラスターゼなどのプロテアーゼにより切断されるアミノ酸も近傍に位置している。そのため、これらプロテアーゼにより分解され得るものと考えられる。すなわち、ヒト以外でも、同様のアミノ酸配列(FKD)を有している、ウシを始めとした動物由来のラクトフェリンからも、同様の炎症誘起作用を有する新規ラクトフェリン・ポリペプチドは分離可能である。

20 産業上の利用可能性

本発明によると、アミノ酸配列(FKD)を有している新規ラクトフェリン・ポリペプチドは催炎作用を有する物質であり、「催炎性ラクトフェリン・ポリペプチド」と呼べる物質であった。そして本発明により、従来のラクトフェリンが持つ有益な生理作用の他に、催炎作用を持つドメインの発見は、ラクトフェリンの有効利用、炎症性疾患ならびに各種感染症など、多くの研究分野の進展に大きく寄与する発明である。

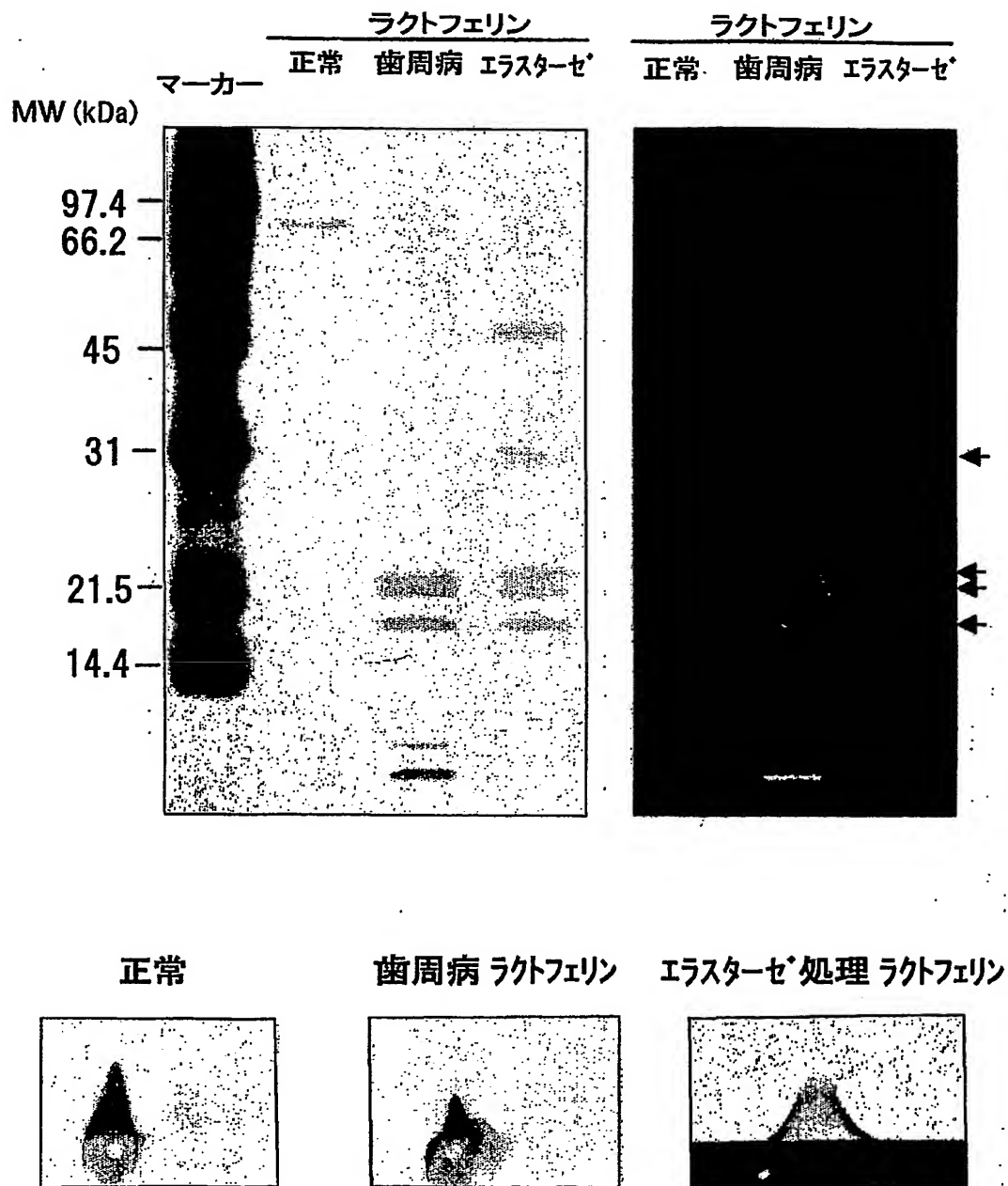
請求の範囲

1. フェニルアラニン(F)、リシン(K)、アスパラギン酸(D)のアミノ酸配列を含むことを特徴とするラクトフェリン・ポリペプチド。
- 5 2. 分子量25kDa未満であることを特徴とする請求項1記載のラクトフェリン・ポリペプチド。
3. ヒト・ラクトフェリンをプロテアーゼにより分解することで得られたことを特徴とする請求項1又は2記載のラクトフェリン・ポリペプチド。
4. 前記プロテアーゼはエラスターゼであることを特徴とする請求項3記載のラクトフェリン・ポリペプチド。
- 10 5. 各種炎症性サイトカイン産生誘導活性を有する請求項1乃至4のいずれか1項記載のラクトフェリン・ポリペプチド、並びに、その合成ペプチドによる炎症誘起物質。
6. 各種ケモカイン産生誘導活性を有する請求項1乃至4のいずれか1項記載のラクトフェリン・ポリペプチド、並びに、その合成ペプチドによる炎症誘起物質。
- 15 7. サイトカインやケモカインなどの炎症メディエーターの産生を誘導する細胞内転写因子である、NF κ Bの発現増強作用を有する請求項1乃至4のいずれか1項記載のラクトフェリン・ポリペプチド、並びに、その合成ペプチドによる炎症誘起物質。
- 20 8. ヒト乃至ウシ・ラクトフェリンをプロテアーゼにより分解後精製して、フェニルアラニン(F)、リシン(K)、アスパラギン酸(D)のアミノ酸配列を含むラクトフェリン・ポリペプチドを、ヒト及至ウシ・ラクトフェリンより単離・精製する製造法。
9. 請求項8記載のラクトフェリン・ポリペプチドを、アミノ酸シーケンサーにより確定し、合成ペプチドを作成することを特徴とする合成ペプチドの製造法。
- 25 10. 前記精製は、SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動法、ゲルろ過法、コンカナバリンA (Con A) アフィニティークロマトグラフィー法、ラクトフェリン抗体結合アフィニティークロマトグラフィー法により、唾液中ラクトフェリンより単離・精製することを特徴とする請求項8記載のラクトフェリン・ポリペプチドの製造方法。

11. 前記精製は、SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動法、ゲルろ過法、コンカナバリンA (Con A) アフィニティークロマトグラフィー法、ラクトフェリン抗体結合アフィニティークロマトグラフィー法により行うことを特徴とする請求項9記載の合成ペプチドの製造法。

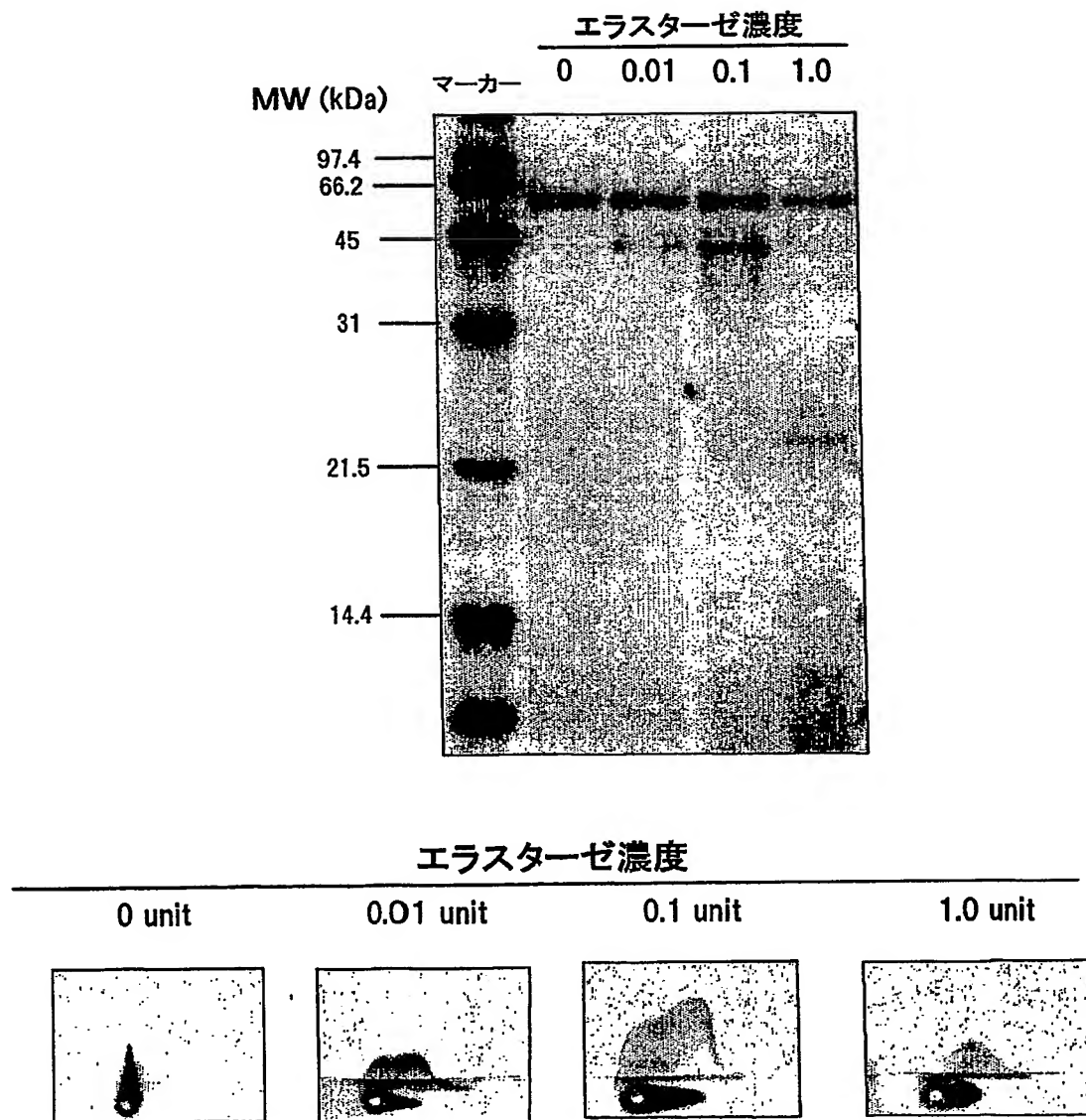
1/4

第1図

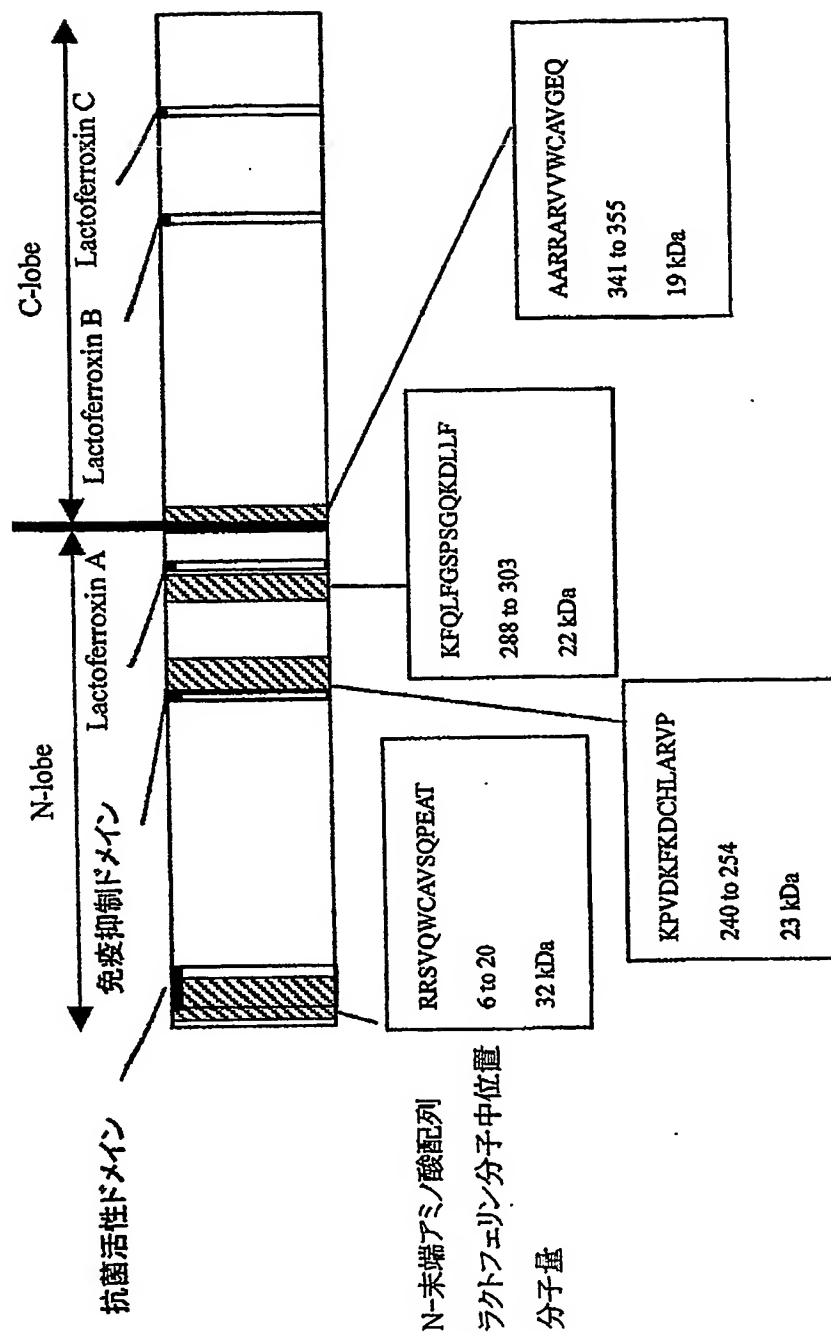


2/4

第2図

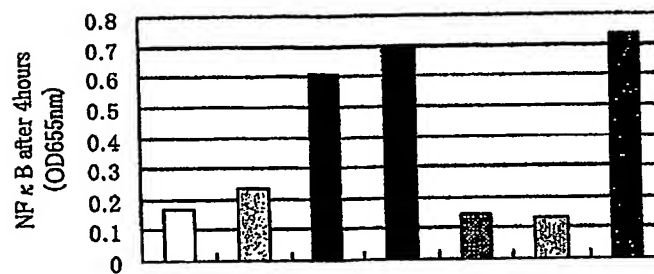
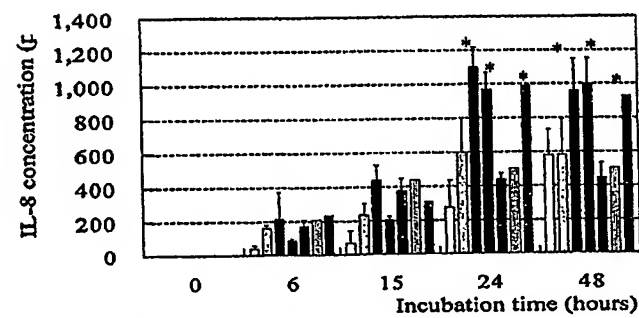
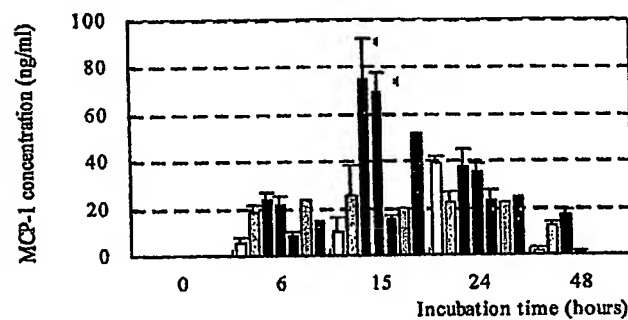
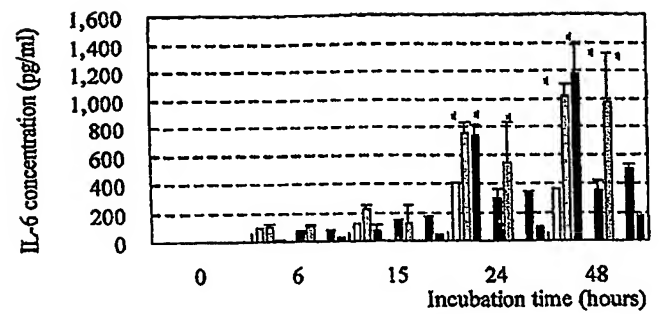


第3図



4/4

第4図



□: 培養液のみ ▨: ヒト・ラクトフェリン ▩: エラストーゼ処理ラクトフェリン ■: HuPep1. ▤: HuPep2. ▥: HuPep3. ▦: HuPep4. *: P<0.01

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001614

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ CO7K14/79, CO7K7/06, CO7K7/08, CO7K1/26, CO7K1/34,
CO7K1/22, C12P21/06, A61K38/40, A61K38/08, A61K38/10,
A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ CO7K14/79, CO7K7/06, CO7K7/08, CO7K1/26, CO7K1/34,
CO7K1/22, C12P21/06, A61K38/40, A61K38/08, A61K38/10,
A61P37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	ROCHARD, E. et al., The N-terminal domain I of human lactotransferrin binds specifically to phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood human lymphocyte receptors., FEBS Lett., 1989, Vol.255, No.1, pages 201 to 204	<u>1-3, 8-11</u> 4-7
<u>X</u> A	BOURNE, Y. et al., Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of Lathyrus ochrus isolectin II complexed to the human lactotransferrin N2 fragment. J.Mol.Biol. 1992, Vol.227, No.3, pages 938 to 941	<u>1-3, 8-11</u> 4-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 May, 2004 (10.05.04)

Date of mailing of the international search report
25 May, 2004 (25.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001614

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	HUTCHENS, T.W. et al., Structurally intact (78-kDa) forms of maternal lactoferrin purified from urine of preterm infants fed human milk: Identification of a trypsin-like proteolytic cleavage event in vivo that does not result in fragment dissociation., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 1991, Vol.88, No.8, pages 2994 to 2998	<u>8-11</u> 1-7
<u>X</u> A	MEAD, P.E. et al., cDNA and protein sequence of bovine lactoferrin., Nucleic Acids Res. 1990, Vol.18, No.23, page 7167.	<u>8-11</u> 1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C07K 14/79, C07K 7/06, C07K 7/08, C07K 1/26, C07K 1/34, C07K 1/22, C12P 21/06,
A61K 38/40, A61K 38/08, A61K 38/10, A61P 37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C07K 14/79, C07K 7/06, C07K 7/08, C07K 1/26, C07K 1/34, C07K 1/22, C12P 21/06,
A61K 38/40, A61K 38/08, A61K 38/10, A61P 37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	ROCHARD, E. et al. The N-terminal domain I of human lactotransferrin binds specifically to phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood human lymphocyte receptors. FEBS Lett. 1989, Vol. 255, No. 1, p. 201-204	<u>1-3, 8-11</u> 4-7
<u>X</u> A	BOURNE, Y. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of Lathyrus ochrus isolectin II complexed to the human lactotransferrin N2 fragment. J. Mol. Biol. 1992, Vol. 227, No. 3, p. 938-941	<u>1-3, 8-11</u> 4-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.05.2004

国際調査報告の発送日

25.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B

9 2 8 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	HUTCHENS, T. W. et al. Structurally intact(78-kDa) forms of maternal lactoferrin purified from urine of preterm infants fed human milk: Identification of a trypsin-like proteolytic cleavage event in vivo that does not result in fragment dissociation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991, Vol. 88, No. 8, p. 2994-2998	<u>8-11</u> 1-7
<u>X</u> A	MEAD, P. E. et al. cDNA and protein sequence of bovine lactoferrin. Nucleic Acids Res. 1990, Vol. 18, No. 23, p. 7167	<u>8-11</u> 1-7